

GLUCOSE-6-PHOSPHATE DEHYDROGENASE AND DNA CAPABLE OF CODING THE SAME

[71] Applicant: MITSUBISHI CHEM

[72] Inventors: HATAKEYAMA KAZUHISA;
KUWABARA KOUICHIROU;
KOBAYASHI MIKI;
YUGAWA HIDEAKI

[21] Application No.: JP08036345

[22] Filed: 19960223

[43] Published: 19970902

```

GAGGAGAG GAGGAGAG GAGGAGAG GAGGAGAG GAGGAGAG GAGGAGAG  10
AGGAGAGAG GAGGAGAGAG GAGGAGAGAG GAGGAGAGAG GAGGAGAGAG  120
GAGGAGAGAG GAGGAGAGAG GAGGAGAGAG GAGGAGAGAG GAGGAGAGAG  140
GAGGAGAGAG GAGGAGAGAG GAGGAGAGAG GAGGAGAGAG GAGGAGAGAG  160
GAGGAGAGAG GAGGAGAGAG GAGGAGAGAG GAGGAGAGAG GAGGAGAGAG  180
GAGGAGAGAG GAGGAGAGAG GAGGAGAGAG GAGGAGAGAG GAGGAGAGAG  200
GAGGAGAGAG GAGGAGAGAG GAGGAGAGAG GAGGAGAGAG GAGGAGAGAG  220
GAGGAGAGAG GAGGAGAGAG GAGGAGAGAG GAGGAGAGAG GAGGAGAGAG  240
GAGGAGAGAG GAGGAGAGAG GAGGAGAGAG GAGGAGAGAG GAGGAGAGAG  260
GAGGAGAGAG GAGGAGAGAG GAGGAGAGAG GAGGAGAGAG GAGGAGAGAG  280
GAGGAGAGAG GAGGAGAGAG GAGGAGAGAG GAGGAGAGAG GAGGAGAGAG  300
GAGGAGAGAG GAGGAGAGAG GAGGAGAGAG GAGGAGAGAG GAGGAGAGAG  320
GAGGAGAGAG GAGGAGAGAG GAGGAGAGAG GAGGAGAGAG GAGGAGAGAG  340
GAGGAGAGAG GAGGAGAGAG GAGGAGAGAG GAGGAGAGAG GAGGAGAGAG  360
GAGGAGAGAG GAGGAGAGAG GAGGAGAGAG GAGGAGAGAG GAGGAGAGAG  380
GAGGAGAGAG GAGGAGAGAG GAGGAGAGAG GAGGAGAGAG GAGGAGAGAG  400
GAGGAGAGAG GAGGAGAGAG GAGGAGAGAG GAGGAGAGAG GAGGAGAGAG  420
GAGGAGAGAG GAGGAGAGAG GAGGAGAGAG GAGGAGAGAG GAGGAGAGAG  440
GAGGAGAGAG GAGGAGAGAG GAGGAGAGAG GAGGAGAGAG GAGGAGAGAG  460
GAGGAGAGAG GAGGAGAGAG GAGGAGAGAG GAGGAGAGAG GAGGAGAGAG  480
GAGGAGAGAG GAGGAGAGAG GAGGAGAGAG GAGGAGAGAG GAGGAGAGAG  500
GAGGAGAGAG GAGGAGAGAG GAGGAGAGAG GAGGAGAGAG GAGGAGAGAG  520
GAGGAGAGAG GAGGAGAGAG GAGGAGAGAG GAGGAGAGAG GAGGAGAGAG  540
GAGGAGAGAG GAGGAGAGAG GAGGAGAGAG GAGGAGAGAG GAGGAGAGAG  560
GAGGAGAGAG GAGGAGAGAG GAGGAGAGAG GAGGAGAGAG GAGGAGAGAG  580
GAGGAGAGAG GAGGAGAGAG GAGGAGAGAG GAGGAGAGAG GAGGAGAGAG  600
GAGGAGAGAG GAGGAGAGAG GAGGAGAGAG GAGGAGAGAG GAGGAGAGAG  620
GAGGAGAGAG GAGGAGAGAG GAGGAGAGAG GAGGAGAGAG GAGGAGAGAG  640
GAGGAGAGAG GAGGAGAGAG GAGGAGAGAG GAGGAGAGAG GAGGAGAGAG  660
GAGGAGAGAG GAGGAGAGAG GAGGAGAGAG GAGGAGAGAG GAGGAGAGAG  680
GAGGAGAGAG GAGGAGAGAG GAGGAGAGAG GAGGAGAGAG GAGGAGAGAG  700
GAGGAGAGAG GAGGAGAGAG GAGGAGAGAG GAGGAGAGAG GAGGAGAGAG  720
GAGGAGAGAG GAGGAGAGAG GAGGAGAGAG GAGGAGAGAG GAGGAGAGAG  740
GAGGAGAGAG GAGGAGAGAG GAGGAGAGAG GAGGAGAGAG GAGGAGAGAG  760
GAGGAGAGAG GAGGAGAGAG GAGGAGAGAG GAGGAGAGAG GAGGAGAGAG  780
GAGGAGAGAG GAGGAGAGAG GAGGAGAGAG GAGGAGAGAG GAGGAGAGAG  800
GAGGAGAGAG GAGGAGAGAG GAGGAGAGAG GAGGAGAGAG GAGGAGAGAG  820
GAGGAGAGAG GAGGAGAGAG GAGGAGAGAG GAGGAGAGAG GAGGAGAGAG  840
GAGGAGAGAG GAGGAGAGAG GAGGAGAGAG GAGGAGAGAG GAGGAGAGAG  860
GAGGAGAGAG GAGGAGAGAG GAGGAGAGAG GAGGAGAGAG GAGGAGAGAG  880
GAGGAGAGAG GAGGAGAGAG GAGGAGAGAG GAGGAGAGAG GAGGAGAGAG  900
GAGGAGAGAG GAGGAGAGAG GAGGAGAGAG GAGGAGAGAG GAGGAGAGAG  920
GAGGAGAGAG GAGGAGAGAG GAGGAGAGAG GAGGAGAGAG GAGGAGAGAG  940
GAGGAGAGAG GAGGAGAGAG GAGGAGAGAG GAGGAGAGAG GAGGAGAGAG  960
GAGGAGAGAG GAGGAGAGAG GAGGAGAGAG GAGGAGAGAG GAGGAGAGAG  980
GAGGAGAGAG GAGGAGAGAG GAGGAGAGAG GAGGAGAGAG GAGGAGAGAG 1000

```

[Go to Fulltext](#)

[57] Abstract:

PROBLEM TO BE SOLVED: To isolate the above enzyme, derived from a coryneform bacterium and capable of catalyzing a pentose phosphate cycle according to a gene recombination technology. SOLUTION: This glucose 6-phosphate dehydrogenase has an amino acid sequence represented by the formula. The enzyme is obtained by expressing a DNA (hereinafter referred to as a zwf gene), obtained from a chromosome of a coryneform bacterium, isolated and determined from a Brevibacterium flavum ML-233 (FERM BP-1497) strain and capable of coding the glucose 6-phosphate dehydrogenase in a coryneform bacterium. When the coryneform bacterium is transformed with the zwf gene, a bacterium capable of highly producing the glucose 6-phosphate dehydrogenase is obtained.

[51] Int'l Class: C12N00904 C07H02104 C12N01509 C12N00120
C12N00904 C12R00113 C12N00120 C12R00113

(19)日本国特許庁 (J P)

(12) 公 開 特 許 公 報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開平9-224661

(43)公開日 平成9年(1997)9月2日

(51)Int.Cl. ⁶	識別記号	序内整理番号	F I	技術表示箇所
C 1 2 N 9/04			C 1 2 N 9/04	D
C 0 7 H 21/04			C 0 7 H 21/04	B
C 1 2 N 15/09	Z N A		C 1 2 N 1/20	A
// C 1 2 N 1/20		9282-4B	15/00	Z N A A
(C 1 2 N 9/04				

審査請求 未請求 請求項の数3 O L (全 9 頁) 最終頁に続く

(21)出願番号	特願平8-36345	(71)出願人	000005968 三菱化学株式会社 東京都千代田区丸の内二丁目5番2号
(22)出願日	平成8年(1996)2月23日	(72)発明者	畠山 和久 茨城県稲敷郡阿見町中央八丁目3番1号 三菱化学株式会社筑波研究所内
		(72)発明者	桑原 孔一郎 茨城県稲敷郡阿見町中央八丁目3番1号 三菱化学株式会社筑波研究所内
		(72)発明者	小林 幹 茨城県稲敷郡阿見町中央八丁目3番1号 三菱化学株式会社筑波研究所内
		(74)代理人	弁理士 長谷川 曉司
			最終頁に続く

(54)【発明の名称】 グルコース-6-リン酸デヒドロゲナーゼおよびそれをコードするDNA

(57)【要約】

【課題】 コリネ型細菌由来のグルコース-6-リン酸デヒドロゲナーゼをコードするDNAを提供する。

【解決手段】 公知の配列を基に設計したプライマーDNAを用いて、プレバクテリウム・フラバムMJ-233のDNAから上記酵素をコードするDNAの部分断片を単離し、ブランクハイブリダイゼーション、インバースPCR反応等の手法を用いて、該酵素をコードするDNAを得る。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 配列表の配列番号1記載のアミノ酸配列で示されるグルコース-6-リン酸デヒドロゲナーゼ。

【請求項2】 請求項1記載のグルコース-6-リン酸デヒドロゲナーゼをコードするDNA。

【請求項3】 配列表の配列番号1記載の塩基配列中629から2083までの塩基配列で示されるグルコース-6-リン酸デヒドロゲナーゼをコードするDNA。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、グルコース-6-リン酸デヒドロゲナーゼおよびそれをコードするDNAに関する。

【0002】

【従来の技術】グルコース-6-リン酸デヒドロゲナーゼ[EC1. 1. 1. 49]は、ペントースリン酸回路の酵素であり、グルコース-6-リン酸とNADP⁺とからホスホグルコノ-δ-ラクトンとNADPHとを生成する不可逆反応の触媒である。グルコース-6-リン酸デヒドロゲナーゼをコードするDNAについては、原核生物ではエシエリヒア・コリ(*Escherichia coli*)由来の遺伝子[J. Bacteriol., Vol. 173, p. 968 (1991)]、エルウィニア・クリサンセミ(*Erwinia chrysanthemi*)由来の遺伝子[Gene, Vol. 101, p. 51 (1991)]、ロイコノストック・メセンテロイデス(*Leuconostoc mesenteroides*)由来の遺伝子[J. Biol. Chem., Vol. 266, p. 13028 (1991)]等が、単離され、その塩基配列が決定されている。

【0003】しかしながら、アミノ酸合成等、産業上広く用いられているコリネ型細菌については、酵素タンパクおよびその塩基配列については報告されていない。

【0004】

【発明が解決しようとする課題】一般に、由来が異なると、酵素遺伝子は宿主において発現しないまたは発現しにくいことから、コリネ型細菌内で発現可能なコリネ型細菌由来のグルコース-6-リン酸デヒドロゲナーゼおよびそれをコードするDNAの単離が望まれていた。

【0005】

【課題を解決するための手段】本発明者らは、上記課題を解決すべく鋭意研究を重ねた結果、遺伝子組み換えの手法を駆使することにより、コリネ型細菌からグルコース-6-リン酸デヒドロゲナーゼおよびそれをコードするDNAが単離可能であることを見出し、本発明を完成するに至った。すなわち、本発明の要旨は、配列表の配列番号1記載のアミノ酸配列で示されるグルコース-6-リン酸デヒドロゲナーゼおよびそれをコードするDNAに存する。

【0006】

【発明の実施の形態】本発明のグルコース-6-リン酸デヒドロゲナーゼ及びそれをコードするDNA(以下、zwf遺伝子と略記する)は、コリネ型細菌の染色体DNA、具体的には、ブレヴィバクテリウム・フラバム(*Brevibacterium flavum*) MJ-233 (FERM BP-1497)株から以下に述べる方法で単離、決定することができる。

【0007】まず、上記コリネ型細菌を常法[例えば、特開昭51-130592号公報参照]に従い培養し、培養物から菌体を集め、該菌体から染色体DNAを抽出する。染色体DNAは、例えば、特開平5-15378号公報の実施例1(A)に記載の方法等により菌体から容易に抽出することができる。エシエリヒア・コリ等のグルコース-6-リン酸デヒドロゲナーゼの一次構造の相同性の高い部分から逆翻訳したオリゴデオキシリボヌクレオチドをプライマーとしてポリメラーゼ連鎖反応(PCR)を行い、zwf遺伝子の部分断片を得ることが出来る。

【0008】該断片を鋳型として、染色体DNA制限酵素分解物に対してサザンハイブリダイゼーションを行い、少なくともzwf断片の一部を含む、染色体DNA制限酵素断片の大きさを決定する。PCRで得られたzwf遺伝子の部分断片を鋳型として、遺伝子ライブラリーFLX11からブラクハイブリダイゼーションで、該断片を含むλファージを単離した。これをクローニングする。

【0009】この染色体DNA断片を適当な制限酵素を用いて切り出し、得られたDNA断片を適当なクローニングベクター、例えばpUC118(宝酒造製)へサブクローニングし、エシエリヒア・コリJM109株(宝酒造製)を形質転換する。この形質転換株を適当な抗生物質選択下で培養し、培養物から菌体を回収し、菌体から常法、例えばアルカリ-SDS法によりプラスミドを抽出する。このプラスミドに挿入されたDNAの塩基配列を決定することにより、本発明のzwf遺伝子を含むDNA断片を取得することができる。

【0010】このDNA断片の塩基配列は、ジデオキシヌクレオチド酵素法[dideoxy chain termination法; Sanger, F et al., Proc. Nat. Acad. Sci. USA, Vol. 74, p. 5463, (1977)]により決定することができる。このようにして決定した上記大きさ約2 kbのDNA断片中の配列を後記配列表の配列番号1に示す。この配列中に存在するオープンリーディングフレームから、本発明のグルコース-6-リン酸デヒドロゲナーゼは、配列番号1記載のアミノ酸配列中1から484で示されるアミノ酸配列からなり、またそれをコードするDNAは、例えば、配列番号1記載の塩基配列中の629番目から2083

番号までの塩基配列で示されるものである。

【0011】本発明における *zwf* 遺伝子は、天然の細菌、例えば、コリネ型細菌の染色体DNAから分離されたもののみならず、本明細書記載の塩基配列を元に通常用いられるDNA合成装置、例えばベックマン社製システム-1プラス (System-1 Plus) を用いて合成されたものであってもよい。また、前記の如くコリネ型細菌の染色体から取得される本発明のDNA断片は、グルコース-6-リン酸デヒドロゲナーゼをコードする機能を実質的に損なうことがない限り、塩基配列の一部の塩基が他の塩基と置換されていても、削除されていてもよく、新たに塩基が挿入されていてもよく、あるいは塩基配列の一部が転位されているものであってもよく、さらにそれらの塩基配列にハイブリダイズする塩基配列であってもよく、これらの誘導体のいずれもが、本発明のグルコース-6-リン酸デヒドロゲナーゼをコードする遺伝子を含むDNA断片に包含されるものである。

【0012】

【実施例】以下、実施例によりさらに具体的に説明する。しかしながら、これらの実施例は本発明の範囲を限定するものではない。

(A) プレバクテリウム・フラバムMJ-233の全DNAの抽出

プレバクテリウム・フラバムMJ-233 (FERM BP-1497) を、半合成培地であるA培地 [組成: 尿素 2g、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 7g、 K_2HPO_4 0.5g、 KH_2PO_4 0.5g、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5g、 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 6mg、 $\text{MnSO}_4 \cdot 4 \sim 6\text{H}_2\text{O}$ 6mg、酵母エキス 2.5g、カザミノ酸 5g、ビオチン 200 μg 、塩酸チアミン 200 μg 、グルコース 2.0g を蒸留水に溶解して1リットルとする] 1リットル中で対数増殖期後期まで培養した後、菌体を回収した。

【0013】得られた菌体をリゾチームを10mg/mlの濃度で含有する溶液 [組成: 10mM NaCl、20mM トリス緩衝液 (pH8.0)、1mM EDTA \cdot 2Na] 15ml に懸濁した。該懸濁液にプロテナーゼKを100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の最終濃度で添加し、これを37℃で1時間インキュベートした。次に、ドデシル硫酸ナトリウムを最終濃度が0.5%になるように添加し、50℃で6時間インキュベートして溶菌させた。得られた溶菌液に等量のフェノール/クロロホルム溶液を添加して室温で10分間穏やかに振盪した後、その全量を10~12℃で20分間、5,000 \times gの遠心分離に供し、その上清画分を分取した。該上清画分中に酢酸ナトリウムをその濃度が0.3Mとなるように添加し、次いで2倍量のエタノールを穏やかに添加した。水層とエタノール層の間に存在するDNAをガラス棒で撪め取り、これを70%エタノールで洗浄して風乾した。得ら

れたDNAは、溶液 [組成: 10mM トリス緩衝液 (pH7.5)、1mM EDTA \cdot 2Na] 5ml を加えて4℃で一晩静置した後、実験に供した。

【0014】(B) *zwf* 遺伝子の部分断片の採取
エシエリヒア・コリ (*Escherichia coli*) [J. Bacteriol., Vol. 173, p. 968 (1991)]、エルウィニア・クリサンセミ (*Erwinia chrysanthemi*) [Gene, Vol. 101, p. 51 (1991)]、および、ロイコノストック・メセンテロイデス (*Leuconostoc mesenteroides*) [J. Biol. Chem., Vol. 266, p. 13028 (1991)] のグルコース-6-リン酸デヒドロゲナーゼをコードするDNA遺伝子の塩基配列をもとに推定したアミノ酸配列の相同性部分の配列をもとに遺伝子クローニング用のPCRプライマーDNAを設計した。

【0015】ポリメラーゼ連鎖反応の一例を以下に示す。反応液は以下の組成である。濃度は最終濃度を表す。[25ユニット/ml Taq DNAポリメラーゼ、10mM トリス-塩酸緩衝液 (pH8.0)、50mM KCl、1.5mM MgCl_2 、0.25mM dATP、0.25mM dCTP、0.25mM dGTP、0.25mM dTTP、0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 染色体DNA飽和水溶液、1 μM プライマー1: AT(ATC)GA(TC)CA(TC)TA(TC)(TC)TIGGIAA(AG)GA (配列番号1記載のアミノ酸配列174~181を元にして設計した配列: 配列番号2)、1 μM プライマー2: GGIA CICCITG(GC)CCAIC (配列番号1記載のアミノ酸配列324~329を元にして設計した配列: 配列番号3)、として100 μl の反応混合液を用いる。]

ポリメラーゼ連鎖反応の反応条件は例えば、94℃で1分、55℃で2分、72℃で3分を1サイクルとする25サイクルである。そして上記反応で得られたDNAを精製した。

【0016】それぞれ最終濃度が、50mM トリス-塩酸緩衝液 (pH7.9)、10mM MgCl_2 、20mM ジチオスレイトール、1mM ATP、1unit/10 μl T4DNAリガーゼ、50ng/10 μl pGEM-Tベクター、10ng/10 μl PCR産物 となるように各成分を添加し、16℃で3時間反応させて、PCR産物DNAを結合させた。

【0017】ついで、常法 [J. Mol. Biol., 53, 159 (1970) 参照] に従って、得られた溶液を用いてエシエリヒア・コリJM109を形質転換した。得られた形質転換菌を選択培地 [組成: トリプトン 10g、酵母エキス 5g、NaCl 5g、寒天 15g、アンピシリン 50mg、イソプロピオチオガラクトシド 0.238g、X-gal 0.2g、ジメチルホルムアミド2ml を蒸留水に溶解

して1リットルとする]に塗抹し、37℃で16時間培養した。

【0018】こうして得られたコロニーを青/白カラースクリーニングした。選択培地上に生育した菌株を、アンピシリンを最終濃度で50 µg/ml含有するL培養液[トリプトン 10g、酵母エキス 5g、NaCl 5gを蒸留水に溶解して1リットルとする]に植菌し、これを37℃で7時間培養した。培養液を4℃で10分間、8,000×gの遠心分離にかけて菌体を回収した。回収した菌体からアルカリ-SDS法[T. Maniatis, E. F. Fritsch, J. Sambrook, Molecular cloning, p. 90-91 (1982) 参照]によりプラスミドを抽出した。

【0019】次に、得られたプラスミドに挿入された染色体由来の約470bpのDNA断片の塩基配列をジデオキシヌクレオチド酵素法により決定した。具体的には、上記培養物より抽出したプラスミドDNAをパーキン・エルマー社製カタリスト800モレキュラー・バイオロジー・ラボステーション(CATALYST 800 Molecular Biology Labstation; Perkin-Elmer)を用いてプロトコルに従い反応させた後、パーキン・エルマー社製373A DNAシーケンサーによりプラスミドの挿入DNA断片の塩基配列を決定した。

【0020】決定した塩基配列を翻訳して得られるタンパク質と、既知のエシエリヒア・コリのグルコース-6-リン酸デヒドロゲナーゼとの相同性の比較により、それがプレバクティウム・フラバムMJ-233のzwf遺伝子の一部(配列表の配列番号1記載の塩基配列中1148番目から1614番目)であることが判明した。

【0021】(C) zwf 遺伝子の部分断片を含む染色体DNA制限酵素断片の大きさ決定

染色体DNAを制限酵素BamHI、EcoRI、HindIII、SalIでそれぞれ分解した。これらをOncor社製Probe tech 2を用いてサザンハイブリダイゼーション用のナイロンメンブレンフィルターを作成した。

【0022】上記、PCRで得られたzwf遺伝子の部分断片を鋳型に、標識にはアマシャム社製[α-³²P]dCTP AA0005を用いて、宝酒造社製RamdomPrimer DNA Labelling Kit Ver. 2の方法でプローブを標識した。フィルターを以下の組成の溶液[5×SSC溶液、5×デンハルト溶液、0.5% ドデシル硫酸ナトリウム(SDS)、0.1mg/ml SIGMA社製SALMON TESTES DNA For Hybridization (10mg/ml)]で65℃で2時間プレハイブリダイゼーションを行った。なお20×SSC溶液

は、以下の組成[3M NaCl、0.3M クエン酸ナトリウム]、100×デンハルト溶液は以下の組成[2% 牛血清アルブミン、2% ポリビニルピロリドン、2% フィコール]である。

【0023】上記で調製したプローブを加え、65℃で一晩、サザンハイブリダイゼーションを行った。フィルターを2×SSC、0.1% SDSで65℃、15分間緩やかに振盪させながら洗浄した。次にフィルターを1×SSC、0.1% SDSで65℃、15分間緩やかに振盪させながら洗浄した。フィルターを風乾した後、オートラジオグラフィーを行った。読みとりは、富士写真フィルム社製パイオイメージングアナライザーBAS-2000を用いた。

【0024】この結果、zwf 遺伝子の部分断片を含む染色体DNA制限酵素断片の大きさは、BamHI断片、EcoRI断片、HindIII断片、SalI断片が、それぞれ約2kb、3kb、8kb、10kbであった。

(D) zwf 遺伝子の部分断片を含む染色体DNA BamHI断片の単離

0.2% マルトース、10mM MgSO₄を添加したLB培養液に、エシエリヒア・コリP2329を植菌し、37℃で培養した。そして遺伝子ライブラリーλFIXIIファージ溶液400 µlにP2329培養液を混合し、37℃で15分間培養した。次に4mlのλトップアガー(50℃保温)を加え、λプレートに均一になるように撒いて、37℃で一晩培養した。

【0025】ニトロセルロースフィルターをλプレート上に空気が入らないように静かに置いて、予めフィルターに書いた目印の点をプレートに写した。フィルターを剥がし、吸着面を上にして、以下の混合溶液に浸した濾紙上に置き、順次5分間処理した(溶液1:[0.5M NaOH、1.5M NaCl]、溶液2:[1M トリス-塩酸(pH7.5)、0.75M NaCl]、溶液3:2×SSC)。フィルターを乾燥させた後、80℃で30分間加熱してフィルターへDNAを固定化した。

【0026】フィルターを以下の混合溶液[5×SSPE、1×デンハルト溶液、50%ホルムアミド、0.1mg/ml SIGMA社製SALMON TESTES DNA For Hybridization (10mg/ml)]にて42℃、1時間プレハイブリダイゼーションを行った。20×SSPEの組成は、3.6M NaCl、0.2M NaH₂PO₄、0.02M EDTAである。上記(C)項で調製したプローブを加え、42℃で一晩、ハイブリダイゼーションを行った。

【0027】フィルターを5×SSPE、1×デンハルト溶液、50%ホルムアミド溶液で42℃、15分間緩やかに振盪させながら洗浄した。次にフィルターを2×SSPE、0.1% ドデシル硫酸ナトリウム溶液で

42℃、15分間緩やかに振盪させながら洗浄した。フィルターを風乾した後、オートラジオグラフィを行った。読みとりは、富士写真フィルム社製バイオイメージングアナライザーBAS-2000を用いた。

【0028】目的ブランクのソフトアガロスを砕いて、200 μ lのSM緩衝液に懸濁した。上記溶液10 μ lを、37℃で3~4時間培養したエシエリヒア・コリP2329株300 μ lと混合し、トップアガロスを加えて λ プレートに撒いた。37℃で一晩培養し、ブランクを形成させた。この λ プレートに4mlのSM緩衝液を加え、トップアガロスを掻き取って、4℃で1時間穏やかに振盪した。トップアガロスを混入させないよう、上澄みを新しいチューブに移し、クロロホルムを数滴加えた。そして5,000rpmで5分間遠心し、上澄みを得た。さらにDNase及びRNase（最終濃度1 μ g/ml）を加え、37℃で15分間保温した。等量の20% ポリエチレングリコール（平均分子量6,000）-2M NaClを加え、氷上で1時間放置した後、4℃、10,000rpmで10分間遠心後、上澄みを完全に除去した。250 μ lのトリス-EDTA緩衝液を加えて懸濁し、5 μ lの10% ドデシル硫酸ナトリウムを加え、68℃で5分間加熱後、10 μ lの5M NaClを加え、等量のフェノール/クロロホルムを加え、よく懸濁した。12,000rpmで10分間遠心し、水層を新しいチューブに移した。イソプロパノール沈殿後、70% エタノール洗浄・乾燥させ、50 μ lのトリス-塩酸緩衝液に懸濁した。

【0029】以上の操作で得られた λ FIXII DNAをBamHIで切断した。切断物をアガロース電気泳動して、zwf遺伝子の一部を含む染色体DNAのBamHI断片を分離・精製した。このBamHI断片約2kbをpUC118でサブクローニングした。サブクローニングしたBamHI断片約2kbを含むpUC118をBamHIで切断し、BamHI断片を回収した。

【0030】(E) zwf遺伝子上流の塩基配列決定 (D)項で得られた大きさ約2kbのDNA断片溶液を制限酵素Sau3AIを用いて37℃で処理してDNA断片を部分分解した。また、クローニングベクターpUC118を制限酵素BamHIで切断した。得られたベクターDNA断片と部分分解DNA断片とを混合し、この混合液にそれぞれ最終濃度が50mM トリス緩衝液(pH7.6)、10mM ジチオスレイトール、1mM ATP、10mM MgCl₂、および1unit/10 μ l T4DNAリガーゼとなるように各成分を添加し、ベクターDNA断片と部分分解DNA断片とを結合させた。

【0031】上記と同様に大きさ約2kbのDNA断片溶液を制限酵素TaqIと反応させて部分分解DNA断片を調製した。クローニングベクターpUC118を制限酵素AccIで切断した後、これを上記と同様にして

部分分解DNAと結合させた。得られたプラスミド混液を用い、常法によりエシエリヒア・コリJM109株を形質転換し、前記の選択培地に塗抹した。

【0032】上記選択培地に生育した菌株を常法に従い液体培養し、得られた培養物よりプラスミドDNAを抽出した。抽出したプラスミドDNAを用いて、ベクターpUC118に挿入された部分分解DNA断片の塩基配列を決定した。そして、これらの個々の配列の連結は、パーキン・エルマー社製のシーケンズ解析ソフト オートアッセンブラー (Auto assembler) を用いて行った。

【0033】この結果、配列表1記載の塩基配列中の1番目から1965番目の塩基配列が判明した。それを翻訳したタンパク質のアミノ酸一次構造と既知のエシエリヒア・コリのグルコース-6-リン酸デヒドロゲナーゼのアミノ酸一次構造との相同性の比較により、配列表1記載の塩基配列中の629番目から1965番目がプレバクテリウム・フラバムMJ-233のグルコース-6-リン酸デヒドロゲナーゼ遺伝子のオープンリーディングフレームの上流であることが判明した。

【0034】(F) zwf遺伝子の全塩基配列決定 オープンリーディングフレームの下流部分をクローニングするために、インバースポリメラーゼ連鎖反応[例えば、結城惇、実験医学、Vol. 8, No. 9 (増刊)、p. 49 (1990) 参照]を行った。まず染色体DNAをEcoRIで分解した。このDNA分解物をアガロースゲル電気泳動した後、(C)で得られた結果を参考にして3kb前後のDNA分解物を含むアガロースゲルを切り出した。

【0035】このアガロースゲル中から、BIO101社製GENECLEAN IIを用いてDNA分解物を抽出した。そして以下の組成[50mM トリス-塩酸緩衝液(pH7.9)、10mM MgCl₂、20mM ジチオスレイトール、1mM ATP、1unit/10 μ l T4DNAリガーゼ、10 μ g/ml 染色体DNAのEcoRI分解物]となるように各成分を添加し、16℃で一晩反応させて、DNA分解物を自己結合させた。

【0036】続いて、プライマー対[CTGAGCTGGAAGATTC TGG (配列番号1記載の塩基配列の1943番目から1959番目: 配列番号4)、CGAAAGCTGCATCATCATC (配列番号1記載の塩基配列の875番目から893番目の相補鎖: 配列番号5)]を用いて、上記の自己結合染色体DNA EcoRI分解物を鋳型に、常法でポリメラーゼ連鎖反応をした。

【0037】得られたDNAを前記の方法でpGEM-Tベクターに結合し、エシエリヒア・コリJM109でサブクローニングし、アルカリ-SDS法で抽出した。そして挿入断片の塩基配列をジデオキシスクレオチド酵素法で決定した結果、配列表1記載の塩基配列中196

6番目から2260番目の塩基配列であることが明らかになった。

【0038】以上の結果、配列表1に示す大きさ約2,260bpのDNA塩基配列を決定した。決定した塩基配列中にはオープンリーディングフレームの存在が認められた。それを翻訳したタンパク質のアミノ酸一次構造と既知のエシエリヒア・コリのグルコース6-リン酸デヒドロゲナーゼのアミノ酸一次構造との相同性の比較により、配列表の配列番号1記載の塩基配列中629番目から2083番目ががブレバクテリウム・フラバムMJ-233のグルコース6-リン酸デヒドロゲナーゼ遺伝子であり、該酵素のアミノ酸配列は、配列番号1記載のアミノ酸配列であることが判明した。

【0039】

配列

GATCCGATGA GGCTTTGGCT CTGCGTGGCA AGGCAGGCGT TGCCAACGCT CAGCGCGCTT	60
ACGCTGTGTA CAAGGAGCTT TTCGACGCCG CCGAGCTGCC TGTAAGGCGC CAACACTCAG	120
CGCCCACTGT GGGCATCCAC CGGCGTGAAG AACCTGCGT ACGCTGCAAC TCTTTACGTT	180
TCCGAGCTGG CTGGTCCAAA CACCGTCAAC ACCATGCCAG AAGGCACCAT CGACGCTGTT	240
CTGGAACCTGG GCAACCTGCA CGGTGACAACT CTGTCCAAC CCGCGGCAGA AGCTGACGCT	300
GTGTTCTCCC AGCTTGAGGC TCTGGGCGTT GACTTGGCAG ATGTCTTCCA GGTCTCGGAG	360
ACCGAGGCCG TGGACAAGTT CGTTGCTTCT TGGAGCGAAC TGCTTGAGTC CATGGAAGCT	420
CGCCTGAAGT AGAATCAGCA CGCTGCATCA GTAACGGCGA CATGAAATCG AATTAGTTCG	480
ATCTTATGTG GCCGTTACAC ATCTTTCATT AAAGAAAGGA TCGTGACGCT TACCATCGTG	540
AGCACAAAAC ACGACCCCTT CCAGCTGGAC AAACCCACTG CGCGACCCGC AGGATAAACG	600
ACTCCCCCGC ATCGCTGGCC CTTCGGGC	628
ATG GTG ATC TTC GGT GTC ACT GGC GAC TTG GCT CGA AAG AAG CTG CTC	676
Met Val Ile Phe Gly Val Thr Gly Asp Leu Ala Arg Lys Lys Leu Leu	
1 5 10 15	
CCC GCC ATT TAT GAT CTA GCA AAC CGC GGA TTG CTG CCC CCA GGA TTC	724
Pro Ala Ile Tyr Asp Leu Ala Asn Arg Gly Leu Leu Pro Pro Gly Phe	
20 25 30	
TCG TTG GTA GGT TAC GGC CGC CGC GAA TGG TCC AAA GAA GAC TTT GAA	772
Ser Leu Val Gly Tyr Gly Arg Arg Glu Trp Ser Lys Glu Asp Phe Glu	
35 40 45	
AAA TAC GTA CGC GAT GCC GCA AGT GCT GGT GCT CGT ACG GAA TTC CGT	820
Lys Tyr Val Arg Asp Ala Ala Ser Ala Gly Ala Arg Thr Glu Phe Arg	
50 55 60	
GAA AAT GTT TGG GAG CGC CTC GCC GAG GGT ATG GAA TTT GTT CGC GGC	868
Glu Asn Val Trp Glu Arg Leu Ala Glu Gly Met Glu Phe Val Arg Gly	
65 70 75 80	
AAC TTT GAT GAT GAT GCA GCT TTC GAC AAC CTC GCT GCA ACA CTC AAG	916
Asn Phe Asp Asp Asp Ala Ala Phe Asp Asn Leu Ala Ala Thr Leu Lys	
85 90 95	
CGC ATC GAC AAA ACC CGC GGC ACC GCc GGC AAC TGG GCT TAC TAC CTG	964
Arg Ile Asp Lys Thr Arg Gly Thr Ala Gly Asn Trp Ala Tyr Tyr Leu	
100 105 110	
TCC ATT CCA CCA GAT TCC TTC GCA GCG GTC TGC CAC CaG CTG GAG CGT	1012
Ser Ile Pro Pro Asp Ser Phe Ala Ala Val Cys His Gln Leu Glu Arg	
115 120 125	

【発明の効果】本発明により提供されるグルコース6-リン酸デヒドロゲナーゼをコードする遺伝子を用いてコリネ型細菌を育種改良することにより、グルコース6-リン酸デヒドロゲナーゼ高産生能を有するコリネ型細菌の取得が可能となる。

【0040】

【配列表】

配列番号：1

配列の長さ：2260

鎖の数：二本鎖

配列の型：核酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：Genomic DNA

TCC GGC ATG GCT GAA TCC ACC GAA GAA GCA TGG CGC CGC GTG ATC ATC	1060
Ser Gly Met Ala Glu Ser Thr Glu Glu Ala Trp Arg Arg Val Ile Ile	
130 135 140	
GAG AAg CCT TTC GGC CAC AAC CTC GAA TCC GCA CAC GAG CTC AAC CAG	1108
Glu Lys Pro Phe Gly His Asn Leu Glu Ser Ala His Glu Leu Asn Gln	
145 150 155 160	
CTG GTC AAC GCA GTC TTC CCA GAA TCT TCT GTG TTC CGC ATC GAC CAC	1156
Leu Val Asn Ala Val Phe Pro Glu Ser Ser Val Phe Arg Ile Asp His	
165 170 175	
TAT TTG GGC AAG GAA ACA GTT CAA AAC ATC CTG GCT CTG CGT TTT GCT	1204
Tyr Leu Gly Lys Glu Thr Val Gln Asn Ile Leu Ala Leu Arg Phe Ala	
180 185 190	
AAC CAG CTG TTT GAG CCA CTG TGG AAC TcC AAC TAC GTT GAC CAC GTC	1252
Asn Gln Leu Phe Glu Pro Leu Trp Asn Ser Asn Tyr Val Asp His Val	
195 200 205	
CAG ATC ACC ATG GCT GAA GAT ATT GGC TTG GGT GGA CGT GCT GGT TAC	1300
Gln Ile Thr Met Ala Glu Asp Ile Gly Leu Gly Gly Arg Ala Gly Tyr	
210 215 220	
TAC GAC GGC ATC GGC GCA GcC CGC GAC GTC ATC CAG AAC CAC CTG ATC	1348
Tyr Asp Gly Ile Gly Ala Ala Arg Asp Val Ile Gln Asn His Leu Ile	
225 230 235 240	
CAG CTC TTG GCT CTG GTT GCC ATG GAA GAA CCA ATT TCT TTC GTG CCA	1396
Gln Leu Leu Ala Leu Val Ala Met Glu Glu Pro Ile Ser Phe Val Pro	
245 250 255	
GCG CAG CTG CAG GCA GAA AAG ATC AAG GTG CTC TCT GCG ACA AAG CCG	1444
Ala Gln Leu Gln Ala Glu Lys Ile Lys Val Leu Ser Ala Thr Lys Pro	
260 265 270	
TGC TAC CCA TTG GAT AAA ACC TCC GCT CGT GGT CAG TAC GCT GCC GGT	1492
Cys Tyr Pro Leu Asp Lys Thr Ser Ala Arg Gly Gln Tyr Ala Ala Gly	
275 280 285	
TGG CAG GGC TCT GAG TTA GTC AAG GGA CTT CGC GAa GAA GAT GGC TTC	1540
Trp Gln Gly Ser Glu Leu Val Lys Gly Leu Arg Glu Glu Asp Gly Phe	
290 295 300	
AAC CCT GAG TCC ACC ACT GAG ACT TTT GCG GCT TGT ACC TTA GAG ATC	1588
Asn Pro Glu Ser Thr Thr Glu Thr Phe Ala Ala Cys Thr Leu Glu Ile	
305 310 315 320	
ACG TCT CGT CGC TGG GCT GGT GTG CCG TTC TAC CTG CGC ACC GGT AAG	1636
Thr Ser Arg Arg Trp Ala Gly Val Pro Phe Tyr Leu Arg Thr Gly Lys	
325 330 335	
CGT CTT GGT CGC CGT GTT ACT GAG ATT GCC GTG GTG TTT AAA GAC GCA	1684
Arg Leu Gly Arg Arg Val Thr Glu Ile Ala Val Val Phe Lys Asp Ala	
340 345 350	
CCA CAC CAG CCT TTC GAC GGC GAC ATG ACT GTA TCC CTT GGC CAA AAC	1732
Pro His Gln Pro Phe Asp Gly Asp Met Thr Val Ser Leu Gly Gln Asn	
355 360 365	
GCC ATC GTG ATT CGC GTG CAG CCT GAT GAA GGT GTG CTC ATC CGC TTC	1780
Ala Ile Val Ile Arg Val Gln Pro Asp Glu Gly Val Leu Ile Arg Phe	
370 375 380	
GGT TCC AAG GTT CCA GGT TCT GCC ATG GAA GTC CGT GAC GTC AAC ATG	1828
Gly Ser Lys Val Pro Gly Ser Ala Met Glu Val Arg Asp Val Asn Met	

385	390	395	400	
GAC TTC TCC TAC TCA GAA TCC TTC ACT GAA GAA TCA CCT GAA GCA TAC				1876
Asp Phe Ser Tyr Ser Glu Ser Phe Thr Glu Glu Ser Pro Glu Ala Tyr				
	405	410	415	
GAG CGC CTT ATC TTg GAT GCG CTG TTG GAT GAA TCC AGC CTT TTC CCT				1924
Glu Arg Leu Ile Leu Asp Ala Leu Leu Asp Glu Ser Ser Leu Phe Pro				
	420	425	430	
ACC AAC GAG GAA GTG GAA CTG AGC TGG AAG ATT CTG GAT CCA ATT CTT				1972
Thr Asn Glu Glu Val Glu Leu Ser Trp Lys Ile Leu Asp Pro Ile Leu				
	435	440	445	
GAA GCA TGG GAT GCC GAT GGA GAA CCA GAG GAT TAC CCA GCA GGT ACG				2020
Glu Ala Trp Asp Ala Asp Gly Glu Pro Glu Asp Tyr Pro Ala Gly Thr				
	450	455	460	
TGG GGT CCA AAG AGC GCT GAT GAA ATG CTT TCC CGC AAC GGT CAC ACC				2068
Trp Gly Pro Lys Ser Ala Asp Glu Met Leu Ser Arg Asn Gly His Thr				
	465	470	475	480
TGG CGC AGG CCA TAATTTAGGG GCAAAAAATG ATCTTTGAAC TTCCGGATAC				2120
Trp Arg Arg Pro				
	484			
CACCACCCAG CAAATTTCCA AGACCCTAAC TCGACTGCGT GAATCGGGCA CCCAGGTCAC				2180
CACCGGCCGA GTGCTCACC TCATCGTGGT CACTGACTCC GAAAGCGATG TCGCTGCAGT				2240
TACCGAGTCC ACCAATGAAG				2260

配列番号：2

配列の長さ：

鎖の数：1本鎖

配列の型：核酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸（合成DNA）

配列

ATHGAYCAYT AYYTNGGNAA RGA

23

Nはイノシンを表す。

配列番号：3

配列の長さ：

鎖の数：1本鎖

配列の型：核酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸（合成DNA）

配列

GGNACNCCNK SCCANC

16

Nはイノシンを表す。

配列番号：4

配列の長さ：

鎖の数：1本鎖

配列の型：核酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸（合成DNA）

配列

CTGAGCTGGA AGATTCTGG

19

配列番号：5

配列の長さ：

鎖の数：1本鎖

配列の型：核酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸（合成DNA）

配列

CGAAAGCTGC ATCATCATC

19

フロントページの続き

(51) Int. Cl. ⁶

識別記号

序内整理番号

F I

技術表示箇所

C 1 2 R 1:13)

(C 1 2 N 1/20

C 1 2 R 1:13)

(72) 発明者 湯川 英明
茨城県稲敷郡阿見町中央八丁目 3 番 1 号
三菱化学株式会社筑波研究所内

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record.**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ **BLACK BORDERS**
- ☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☐ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☒ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER: _____**

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.